

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *PROTOTHECA SPP.* NEL LATTE CRUDO EROGATO TRAMITE DISTRIBUTORI AUTOMATICI: ASPETTI DI SANITA' PUBBLICA

SURVEY ON PROTOTHECA SPP. OCCURRENCE IN RAW MILK FROM AUTOMATIC DISPENSER: PUBLIC HEALTH CONCERN

Cammi G.¹, Merenda M.¹, Garilli F.², Ricchi M.¹, Garbarino C.¹, Arrigoni N.¹, Belletti GL.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

²Corso di Laurea in "Tecnologie delle Produzioni animali e sicurezza degli alimenti" Facoltà di Medicina Veterinaria. Università di Parma.

SUMMARY

Prototheca spp. are colorless unicellular algae ubiquitous in nature and opportunistic pathogens for humans and animals. Since *Prototheca* is an important cause of bovine mastitis, milk, as well as dairy products, can be contaminated and represent a potential mean of transmission of this microorganism to man. We carried out a survey on the automatic milk dispensers in the Emilia-Romagna Region (Northern Italy), to evaluate human exposure to *Prototheca* through raw milk. Milk samples were collected from 177 automatic dispensers, distributing milk from 117 dairy herds. *Prototheca spp.* was isolated on 17 milk samples (9,6 %) produced by 14 dairy herds. The results of molecular characterization indicate that the isolates were *P. zopfii* genotype 2 e *P. blaschkeae*, both species being associated with human diseases. Our investigation points out the importance of raw milk as a carrier of microorganisms potentially harmful to humans.

KEYWORDS

Prototheca spp., raw milk, zoonosis

INTRODUZIONE

Prototheca è una microalga unicellulare eterotrofa, filogeneticamente correlata al Genere *Chlorella*, immobile, priva di attività fotosintetica, a riproduzione asessuata, ampiamente diffusa nell'ambiente dove vive allo stato saprofitico. *Prototheca* è in grado di sopravvivere nella maggior parte degli habitat ambientali delle fasce terrestri tropicali e temperate, e può essere isolata da una grande varietà di materiali, quali vegetali in decomposizione, piante legnose ed erbacee, terreno, acque dolci e salate, acque di scarico, deiezioni umane ed animali (bovino, suino, cervo, cane, ratti, ecc.), liquame, letame, ambienti di allevamento. La incostante efficacia dei trattamenti di clorazione delle acque nei confronti di *Prototheca spp.*, ne permette la sopravvivenza negli scarichi urbani, agricoli e

industriali, con conseguente diffusione nell'ambiente (1, 2, 3, 4).

Attualmente, nell'ambito del genere *Prototheca*, vengono riconosciute 6 diverse specie: *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca zopfii*, *Prototheca blaschkeae*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca ulmea*. e *P. cutis* sp. nov. (5, 6, 7). La specie *P. zopfii*, sulla base di caratteristiche biochimiche e sierologiche, era stata inizialmente differenziata in tre diversi biotipi (8). Studi bio-molecolari, condotti sulla sequenza del rDNA 18S, hanno riclassificato *P. zopfii* nei due genotipi 1 e 2, mentre i ceppi riferibili all'ex biotipo 3 sono stati ricondotti alla nuova specie *P. blaschkeae* (6).

Ad alcune specie di *Prototheca* è riconosciuto il ruolo di patogeni opportunisti: in presenza di condizioni predisponenti (compromissione del sistema immunitario, condizioni igieniche precarie), possono acquisire la capacità di

determinare l'insorgenza di malattia nell'uomo e negli animali.

La specie maggiormente coinvolta nella patologia umana è *P. wickerhamii*, seguita da *P. zopfii* e *P. blaschkeae*. Il primo caso umano di Protothecosi è stato descritto da Davies nel 1964 (9), come una lesione cutanea di tipo verrucoso sviluppata nel piede di un coltivatore di riso della Sierra Leone, dalla quale venne isolata una Prototheca, oggi riconosciuta essere *P. zopfii*. Da allora fino al 2007, sono stati segnalati in letteratura 117 casi, di cui il 66% (n=77) riferibili ad infezioni cutanee, il 19% (n=22) a infezioni sistemiche e il 15% (n=18) a bursite olecranica. Generalmente negli individui immunocompetenti si osservano infezioni localizzate cutanee o sottocutanee (spesso su base traumatica), mentre le forme disseminate o "multiorganiche" si instaurano più facilmente in individui con compromissioni di vario tipo del sistema immunitario, con malattie croniche o a seguito di pratiche mediche invasive (9).

In campo animale la Protothecosi più diffusa è sicuramente la mastite bovina, un'infezione della mammella a carattere cronico evolutivo di origine ambientale, refrattaria ai trattamenti terapeutici, con la tendenza, in assenza di misure di contenimento, ad assumere il carattere di mastite contagiosa, coinvolgendo numerose bovine in lattazione (10, 11, 12).

La mastite bovina è attribuita primariamente a *P. zopfii* genotipo 2 e, seppur più raramente, a *P. blaschkeae* (13, 14). *P. zopfii* genotipo 1, sembra priva di potere patogeno e non è mai stata isolata nel latte di mammella, ma solo nell'ambiente. Da ricordare, inoltre, che Marques et al. (2006) hanno segnalato, per la prima volta, un caso di mastite clinica nel bovino, sostenuta da *P. wickerhamii* (15).

La specie *P. zopfii* genotipo 2 è stata recentemente segnalata anche nell'uomo come causa di una linfadenite granulomatosa localizzata al collo, in un soggetto immunocompetente, in normale stato di salute e, per il quale, non è stato possibile risalire a pregressi eventi traumatici (16).

La Protothecosi è una patologia conosciuta anche in altre specie animali, come cane, gatto, capra, pecora e cervo (17, 18, 19, 9).

L'esposizione dell'uomo a Prototheca, oltre che ambientale, può avvenire anche tramite alimenti o acque contaminate: Prototheca è stata isolata da carni di suino, bovino e bufalo (*P. wickerhamii* e *P. zopfii*), da acque potabili ad uso umano e gelato (*P. wickerhamii*), insalata (*P. zopfii*), molluschi e granchi (1). Costa et al. (1998), hanno descritto un caso di enterite

nell'uomo associato al consumo di formaggio fresco contaminato da *P. zopfii*, isolata dalle feci del paziente. Il formaggio in questione era stato prodotto con latte di un allevamento in cui era diffusa la mastite da Prototheca (20). *P. stagnora*, specie considerata priva di patogenicità, è stata isolata da carne di pollo congelata, a dimostrazione del fatto che, comunque, la microalga può essere un possibile contaminante degli alimenti crudi (21).

La patogenesi della Protothecosi nell'uomo è largamente sconosciuta; l'isolamento di *Prototheca spp.* da feci, saliva, mucose delle prime vie respiratorie, pelle ed unghie, viene considerata l'espressione di una colonizzazione, più o meno transitoria, dovuta alla continua esposizione dell'uomo alle principali fonti di contaminazione, quali ambiente, alimenti, acqua ed animali (9). Quindi, se una delle vie di infezione può essere certamente la penetrazione della microalga attraverso lesioni cutanee, non è ancor possibile stabilire, se l'ingestione di Prototheca per via orale possa portare all'insorgenza di una patologia all'apparato gastro-enterico ed, eventualmente, di una infezione generalizzata. Non mancano segnalazioni di patologie gastro-enteriche dell'uomo a carattere persistente, molto spesso resistenti alle terapie, associate alla presenza di Prototheca nelle feci, che, tuttavia, non hanno permesso di chiarire il ruolo eziologico della microalga (22). Al contrario il ruolo eziopatogenetico di *P. zopfii*, sembra ormai ben definito nell'insorgenza di una forma di enterocolite nel cane (18).

Nel nostro territorio, un importante fonte di esposizione alimentare di Prototheca per il consumatore, è rappresentata, probabilmente, dal latte crudo. Al fine di valutare l'entità di tale esposizione, è stata attuata un'indagine volta a rilevare l'eventuale presenza di *Prototheca spp.* nel latte crudo, che viene messo a disposizione dei consumatori tramite gli erogatori automatici presenti nel territorio della Regione Emilia-Romagna.

MATERIALI E METODI

Nel periodo maggio 2008 - ottobre 2009 sono stati controllati, presso il Laboratorio Latte della Sezione di Piacenza, 177 campioni di latte crudo erogati da altrettanti distributori automatici, pari al 76% delle macchine erogatrici in funzione nel 2009 nelle varie Province dell'Emilia-Romagna (Tabella 1).

I campioni, prelevati per i controlli analitici previsti dalla Determinazione della Regione Emilia-Romagna N. 004418 del 21/04/2008, (23) da operatori dei Servizi Veterinari, provenivano

da 117 differenti allevamenti, molti dei quali, infatti, erano proprietari di diversi erogatori automatici (Tabella n° 1).

L'esame per la ricerca di *Prototheca spp.* è stato condotto, dopo opportuna agitazione del campione, inoculando direttamente 0,5 ml di latte in una piastra di PIM (Prototheca Isolation Medium) (24), successivamente incubato a 30 °C per 72 ore in condizioni di aerobiosi. Al termine del periodo di incubazione le colonie sospette sono state identificate mediante osservazione della morfologia macroscopica (stereomicroscopio) e microscopica (colorazione con lactophenol cotton blue). I campioni con conteggi superiori alle 300 ufc/ piastra venivano sottoposti a successive diluizioni per il conteggio delle ufc/ml. Da ciascuna delle piastre con sviluppo di *Prototheca*, una o più colonie con morfologia rappresentativa sono state prelevate e trapiantate su Tryptone Soya Yeast Extract Agar Slant per la successiva identificazione mediante PCR secondo la metodica di Roesler et al. (2006). L'indagine biomoecologica condotta sulle colonie isolate, è stata in grado di differenziare le di-

verse specie di *Prototheca* e nel caso di *P. zopfii*, anche l'appartenenza al genotipo 1 e 2. In breve sono state allestite tre diverse reazioni PCR, utilizzando i primers:

- Proto18-4f, Proto18-4r e PZGT 1/r per *P. zopfii* genotipo 1
- Proto18-4f, Proto18-4r e PZGT 2/r per *P. zopfii* genotipo 2
- PZGT 3-IK/f, PZGT 3-IK/R e PZGT 3/r per *P. blaschkeae*.

RISULTATI

Prototheca spp. è stata evidenziata in 17 campioni, pari al 9,6% dei campioni di latte ed all'11,96% degli allevamenti produttori del latte erogato (Tabella 1).

Il numero di ufc/ml di *Prototheca* nei campioni positivi è risultato compreso tra 2 e 1200 (Tabella 2). L'identificazione tramite PCR delle specie isolate ha rilevato la presenza di *P. zopfii* genotipo 2 in tutti i campioni positivi ed, in uno di questi, anche la presenza di *P. blaschkeae*.

Tabella 1. Positività per *Prototheca spp.* nei campioni di latte crudo

	PC	PR	RE	MO	BO	FE	RA	FC	RN	Totale
N° distributori automatici di latte crudo in funzione nel 2009 nella Regione Emilia-Romagna.	26	26	36	38	60	10	15	6	16	233
N° distributori automatici controllati	21	11	31	30	55	6	8	3	12	177
Allevamenti produttori	16	9	21	20	34	4	5	3	5	117
Campioni di latte crudo positivi	1	1	3	4	6	0	0	0	2	17 (9,6%)
Allevamenti produttori positivi	1	1	3	4	4	0	0	0	1	14 (11,96%)

Tabella 2. Entità della contaminazione da *Prototheca spp.* nei campioni positivi di latte crudo

ufc/ml <i>Prototheca</i> <i>spp.</i>	<10	10-100	100-1000	>1000	TOT.
Campioni di latte crudo positivi	8 (47%)	2 (11,7%)	6 (35,3%)	1 (5,9%)	17

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il monitoraggio sul latte erogato dai distributori automatici ha evidenziato una percentuale di positività per presenza di *Prototheca spp.* non trascurabile (9,6%), dimostrando che questo alimento può essere una fonte reale di esposizione del consumatore alla microalga. Già in una precedente indagine, il controllo del latte di massa di 350 allevamenti ubicati nella pianura

Padana, aveva rilevato la presenza della microalga nel 15% dei campioni (25).

In 6 dei campioni positivi, l'entità della contaminazione, è stata superiore a centinaia di cellule di *Prototheca* per ml di latte, mentre in 1 ha superato le 1000 ufc/ml. Le specie di *Prototheca* isolate, *P. zopfii* genotipo 2 e *P. blaschkeae*, sono entrambe segnalate come causa di patologie dell'uomo. Questi dati pongono degli interrogativi relativamente alle conseguenze di una continua esposizione dei consumatori alla microalga, in particolare, di quelle fasce di popolazione considerate a rischio per deficit immunitario di tipo fisiologico o patologico (bambini, anziani, soggetti con altre patologie in atto, soggetti immunodepressi). E' opportuno anche ricordare che *P. zopfii*, a differenza di altri microrganismi, può presentare caratteristiche di resistenza ai tradizionali trattamenti di pastorizzazione, utilizzati per il risanamento del

latte, ma anche di altri alimenti (26). La termo-resistenza di *Prototheca* è da imputarsi probabilmente alla protezione fornita dalla sporopollenina, un componente della parete della microalga che le conferisce resistenza anche ad altri agenti chimici e fisici.

L'obbligo, imposto dal Legislatore (27), di sottoporre il latte crudo, prima del consumo, alla bollitura (pratica non sempre rispettata dal consumatore), appare, anche in questo caso, indispensabile per evitare il contatto con microrganismi indesiderati.

La Protothecosi, a dispetto della diffusione ubiquitaria della microalga, è considerata una patologia dell'uomo ad insorgenza sporadica; non si può comunque escludere che la reale incidenza della patologia sia decisamente più elevata di quanto è possibile desumere dal numero dei casi riportati nella letteratura medica. Benché non ne sia a tutt'oggi dimostrabile con certezza il carattere zoonosico, la Protothecosi presenta alcuni aspetti clinici ed eziologici comuni ad uomo ed animali, che impongono particolare attenzione nel controllo delle fonti animali di questa infezione.

Nel caso specifico, la riduzione dell'esposizione dell'uomo all'alga *Prototheca* eventualmente presente nel latte crudo, deve passare necessariamente attraverso il controllo dell'infezione mammaria nell'allevamento bovino da latte, ma anche attraverso il rispetto rigoroso delle norme igienico-sanitarie che la legislazione vigente impone per la vendita ed il consumo di questo alimento.

BIBLIOGRAFIA

1. Pore R.S., Barnett E.A., Barnes Jr. W.C., Walker J.D. (1983). *Prototheca* ecology. *Mycopathologia* 81:49-62.
2. Pore R.S., Boehm F. D. (1986). *Prototheca* (Achloric alga) in wastewater. *Water, Air and Soil Pollution* 355-362.
3. Pore R.S., Shahan T.A. (1988). *Prototheca zopfii*: natural transient occurrence in pigs and rats. *Mycopathologia* 101:85-88.
4. Casal M., Solis F. (1981). First isolation of *Prototheca* species in Spain. *Mycopathologia* 74: 55-56
5. Pore R.S. (1985). *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia* 90:187-189
6. Roesler U., Moller A., Hensel A., Baumann D., Tryen U. (2006). Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *I. J. Evol. Microbiol.* 56:1419- 1425.
7. Satoh K., Ooe K., Nagayama H., Makimura K. (2009). *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int.J. Syst.Evol. Microbiol.* On line from Aug 7 as doi:10.1099/ijs.0.016402-0.
8. Roesler U., Scholz H., Hensel A. (2003). Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 53:1195-1199.
9. Lass-Florl C., Mayr A. (2007). Human Protothecosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:230-242.
10. Arrigoni N., Bertocchi L., Bolzoni G., Marchi V., Bronzo V., Varisco G. (2007). *Prototheca zopfii* intramammary infections control in high prevalence herd: preliminary results. NMC 46th Annual Meeting, January 21-24, San Antonio, Texas.
11. Costa E.O., Ribeiro A.R., Melville P.A., Prada M.S., Carciofi A.C., Watanabe E.T. (1996). Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. *Mycopathologia* 133: 85-88.
12. Janosi S., Ratz F., Szigeti G., Kulcsar M., Kerenyi J., Lauko T., Katona F., Huszenicza G. (2001). Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *The Vet. Quarterly* 23 (2): 58-61.
13. Marques S., Silva E., Kraft C., Carnevalheira J., Videira A., Volker A. R. Huss, Thompson G. (2008). Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *J. Clin. Microbiol.* 10: 1-15.
14. Moller A., Truyen U., Roesler U. (2007). *Prototheca zopfii* genotype 2 – The causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet. Microbiol.*, 120: 370-374.
15. Marques S., Silva E., Carnevalheira J., Thompson G. (2006). Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 89:4202-4204.
16. Zhang Q., Wenig X., Li L., Zhu L., Yu S., Chen S., Xiang Y., Wan H., Ra Y., Kang K. (2010). An unusual case of granulomatous lymphadenitis due to *Prototheca zopfii* var. *portoricensis* in an immunocompetent man in China. *Int. J Infect Dis.* doi:10.1016/j.ijid.2009.10.003.
17. Camboim E.K.A., Garino J. F., Dantas A.F.M., Simoes S.V.D., Melo M.A., Azevedo E.O., Mota R.A., Riet-Correa F., (2010). Protothecosis by *Prototheca wickerhamii* in goats. *Mycoses* 1-5.
18. Greene C.E. (1998). *Infectious Disease of the Dog and Cat.* 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, pag. 430-435.

19. Thiele D., Bergmann A. (2002). Protothecosis in human medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204: 297-302.
20. Costa E.O., Melville P.A., Ribeiro A.R., Watanabe E.T. (1998). Relato de un caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca spp.* *Revta Napgama* 1(1):9-10
21. Alaboudi A.R., Shnawa I.M.S. (1990). Isolation of *Prototheca stagnora* from frozen poultry meat. *Food Control* 185-186
22. Casal M., Zerolo J., Linares U.J., Ibarra A. (1983). First human case of possibile Protothecosis in Spain. *Mycopathologia* 83:19-20.
23. Determinazione della Regione Emilia-Romagna N. 004418 del 21/04/2008. Vendita diretta al consumatore di latte crudo vaccino, ovi-caprino, bufalino e asinino dell'azienda di produzione. Prot. VET/08/96913.
24. Pore R.S. (1973). Selective medium for the isolation of *Prototheca*. *Applied Microbiology*. 26 (4): 648-649.
25. Cammi G. Arrigoni N., Belletti GL., Garilli F., Ricchi M., Vicari N., Tamba M., Galletti G. (2008). Indagine sulla presenza di *Prototheca spp.* in allevamenti di bovine da latte del Nord Italia. Atti X Congresso Nazionale SIDiLV, Alghero. 22-24 Ottobre 2008, 120-121
26. Melville P.A., Watanabe E.T., Benites N.R., Ribeiro A.R., Silva J.A.B., Garino F., Costa E.G. (1999). Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia* 146 (2):79-82.
27. Ordinanza 10 dicembre 2008. Misure urgenti in materia di produzione, commercializzazione e vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana. Ministero del Lavoro, della Salute e delle politiche Sociali. (GU n.10 del 14-1-2009)